

THESIS

MUNICH 1965

**Über die Hemmung der Fettsäuresynthese
in vivo
durch Avidin, Albumin und Globulin**

Dorte-Elisabeth Lienau

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

**Über die Hemmung der Fettsäuresynthese
in vivo
durch Avidin, Albumin und Globulin**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dorte-Elisabeth Lienau
aus Burg auf Fehmarn

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan: Prof. Dr. O. HUG

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 5. 1965

MEINER MUTTER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

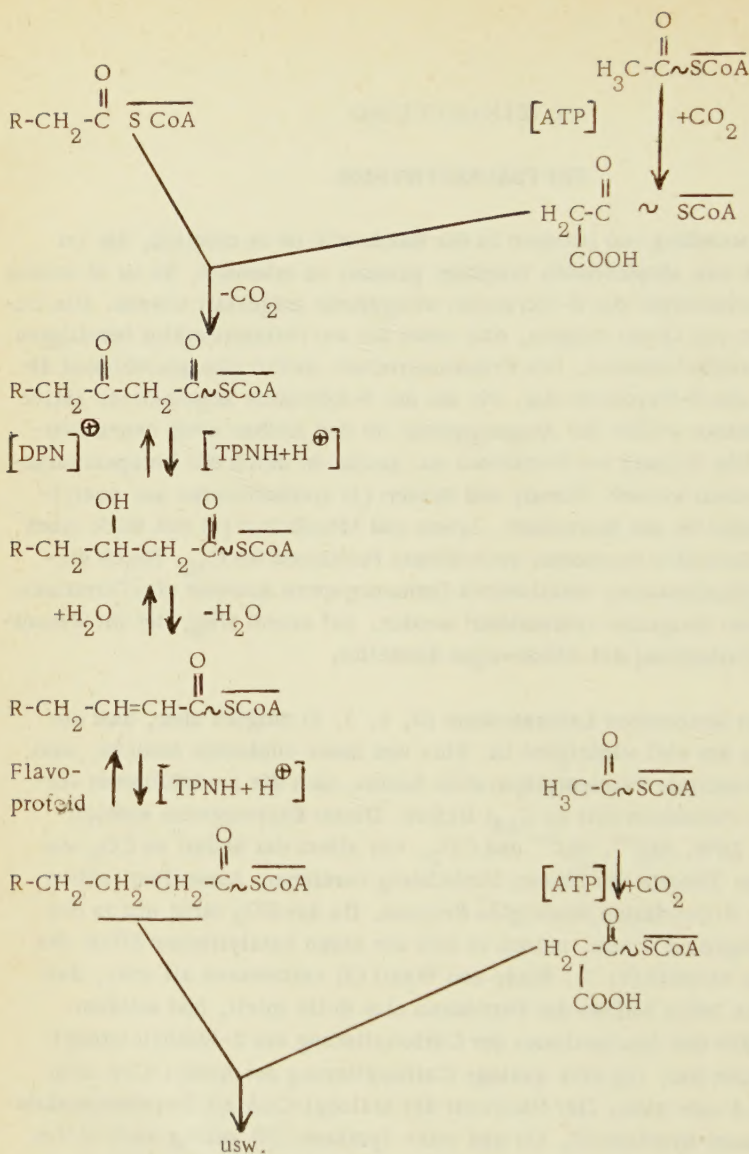
	Seite
I. EINLEITUNG:	7
Fettsäuresynthese	7
Biotin	9
Avidin	16
II. PROBLEMSTELLUNG	18
III. METHODIK	20
IV. ERGEBNISSE	23
V. DISKUSSION	30
VI. ZUSAMMENFASSUNG	34
VII. LITERATUR	36
VIII. LEBENS LAUF	40

I. EINLEITUNG

FETTSÄURESYNTHESE

Seit der Verwendung von Isotopen in der Biochemie ist es möglich, die im Stoffwechsel sich abspielenden Vorgänge genauer zu erkennen. So ist in letzter Zeit der Mechanismus der β -Oxydation weitgehend aufgeklärt worden. Die Untersuchungen von Lynen zeigten, dass jedes der am Fettsäurezyklus beteiligten Enzyme reversibel arbeitet. Die Fettsäuresynthese stellte also anscheinend die Umkehrung der β -Oxydation dar, die aus der β -Ketosäure abgespaltene aktive Essigsäure musste wieder der Ausgangspunkt für den Aufbau einer neuen Fettsäure sein. Die Bildung von Fettsäuren aus Acetat ist durch die Isotopenmethode nachgewiesen worden. Stansly und Beinert (1) synthetisierten aus Acetyl-CoA Fettsäuren bis zur Buttersäure, Lynen und Mitarbeiter (2) mit Hilfe eines neuen reduzierenden Fermentes auch höhere Fettsäuren bis C_{12} . Durch dieses in den Mitochondrien lokalisierten Fermentsystems konnten also Fettsäuren aus aktivierter Essigsäure synthetisiert werden, auf einem Weg, der im Wesentlichen die Umkehrung des Abbauweges darstellte.

Versuche des Greenschen Laboratoriums (3, 4, 5, 6) zeigten aber, dass ein anderer Weg der viel wichtigere ist. Eine von ihnen entdeckte lösliche, also extramitochondriale Fermentpräparation konnte auch die am häufigsten vorkommenden Fettsäuren (bis zu C_{18}) liefern. Dieses Enzymsystem enthielt ATP, CoA, DPN, Mg^{++} , Mn^{++} und CO_2 . Vor allem der Bedarf an CO_2 war nicht mit der Theorie der blossen Umkehrung vereinbar. Ausserdem fehlten zwei für die β -Oxydation benötigten Enzyme. Da das CO_2 nicht mit in die Fettsäure eingebaut wurde, musste es sich um einen katalytischen Effekt des Bikarbonates handeln (4, 7). Brady und Wakil (5) vermuteten als erste, dass Malonyl-CoA beim Aufbau der Fettsäuren eine Rolle spielt, und seitdem Lynen (8) 1959 den Mechanismus der Carboxylierung des β -Methylcrotonyl-CoA aufgeklärt hat, lag eine analoge Carboxylierung des Acetyl-CoA zum Malonyl-CoA sehr nahe. Der Nachweis des Malonyl-CoA als Zwischenprodukt in der Fettsäure-Synthese (9, 11) und seine Synthese (10) gelang auch in den darauffolgenden Versuchen. Die hauptsächliche Bildung der Fettsäuren, auch der hochungesättigten (12), läuft also über eine Carboxylierung des Acetyl-CoA zum Malonyl-CoA und die aktivierte Fettsäure unter CO_2 -Eliminierung. Dadurch entsteht auch eine um 2 C-Atome längere Fettsäure.



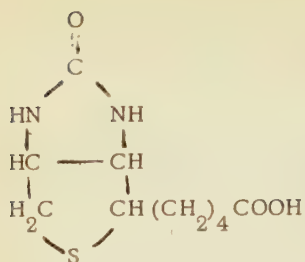
Die Acetyl-CoA-Carboxylase, die diese Carboxylierung bewirkt, enthält als Wirkungsgruppe das Biotin, und der genaue Mechanismus dieser Reaktion soll daher im nächsten Kapitel beschrieben werden.

So stellt der Aufbau der vorwiegend vorkommenden Fettsäuren also nicht einfach die Umkehrung ihres Abbaus dar. Auf diese Weise können die Zellen Abbau und Synthese unabhängig voneinander regulieren.

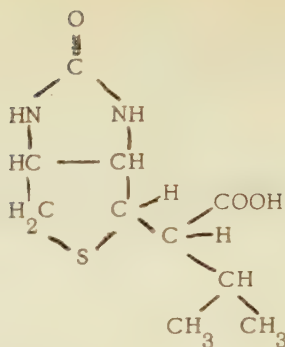
BIOTIN

Als man im Jahre 1933 entdeckte, dass einige Vitamine auch Bestandteile des Fermentsystems sein könnten, wurde ein ganz neuer Abschnitt in der Vitaminforschung eingeleitet. Diese Verwertung zum Aufbau von Enzymwirkungsgruppen ist seitdem biologisches Prinzip und gilt für fast alle wasserlöslichen Vitamine wie Nicotinsäureamid, Thiamin, Pyridoxin, Pantothensäure, p-Aminobenzoessäure bzw. Folsäure und Cobalamin. Als wasserlösliches Vitamin kann auch das Biotin oder Vit. H diese wichtige Vitaminfunktion erfüllen. Dies zeigt, wie enorm gross seine Aufgabe im Intermediärstoffwechsel ist, und wie unentbehrlich daher seine Anwesenheit für uns Menschen.

Biotin wurde 1934 erstmals von Kögl aus Trockeneigelb in Form des Methyl-esters dargestellt. Durch Destillation einer basischen Esterfraktion im Hochvakuum erhielt er eine grünblau fluoreszierende Fraktion, die aus Chloroform bei Zusatz von Petroläther in farblosen Nadeln auskristallisierte (13). Einen zweiten Stoff gewann 1940 du Vigneaud und György aus der Leber und aus Milchkonzentraten. Diese beiden Substanzen wurden ursprünglich als verschieden angesehen und als α -Biotin (Eigelb, Hefe) und β -Biotin (Leber, Milch) unterschieden. Du Vigneaud und György konnten aber zeigen, dass beide nur isomer zueinander waren, und stellten auch die Identität (16) des Biotins mit dem schon lange bekannten Vit. H (14, 15) fest. 1942 wurde seine Strukturformel aufgestellt (17), diese dann erstmals bestätigt durch seine Synthese durch Folkers und Harris (18) im Jahre 1943 und später mit abweichenden Methoden auch in anderen Laboratorien (z.B. Grüssner-Bourquin 1945, Goldberg 1946, Baker 1947). Biotin ist also eine Schwefel- und Stickstoffhaltige Carbonsäure. Sie stellt ein Kondensationsprodukt von einem hydrierten Imidazol- und einem hydrierten Thiophenring dar, der als Seitenkette wiederum eine Valeriansäure (β -Biotin) oder eine Isovaleriansäure (α -Biotin) enthält.



β -Biotin



α -Biotin

Biotin bildet kristallisierende Methylester. Dies ist wichtig, denn eine Isolierung und damit der Nachweis der Allophansäurestruktur des CO_2 im Biotin und im Biotin-Enzym (siehe später) konnte nur durch eine Stabilisierung dieser sehr labilen CO_2 -Verbindung (19, 20) gebracht werden, das heisst, nur durch die Methylierung.

Biotin wird durch stärkere Säuren, UV-Strahlen oder oxydierende Stoffe wie Wasserstoffperoxyd zerstört (21). Es ist aber hitzestabil im Gegensatz zu seinem spezifischen Hemmstoff, dem noch später zu besprechenden Avidin. Dies ist bemerkenswert, denn lediglich durch Erhitzen kann das Biotin von diesem Hemmstoff wieder freigesetzt werden.

Wie auch die anderen B-Vitamine befindet sich das Biotin in jeder lebenden Zelle der Tier- und Pflanzenwelt. Dies deutet schon auf seine grosse biologische Bedeutung hin. So hatte Kögl es z. B. entdeckt bei Untersuchungen über den Wuchsstoffbedarf von Hefezellen, und da sein neu hergestelltes Kristallisat die gleichen Eigenschaften hatte wie das Bios II, die Hauptkomponente des komplexen Hefewachstumsfaktors, gab er ihm auch den Namen Biotin. In 36 000 kg Hefe ist 1 g Biotin enthalten (13). Doch nicht nur für Hefe, auch für Bakterien, Pilze, Insekten und grüne Pflanzen, besonders für deren Wurzel- und Sprossgebiete, ist das Biotin ein unentbehrlicher Wachstumsstoff.

Dass das Biotin auch unerlässlich für die höheren Tiere ist, erkannte schon 1927 die Amerikanerin Miss Boas. Überhaupt begann in diesem Jahr die Geschichte des Biotins. Miss Boas entdeckte, dass die sogenannte "egg-white-injury", eine ekzemartige Dermatitis, die Ratten nach Verfütterung grosser Mengen rohen Hühnereiweisses bekommen hatten, durch Zugabe eines thermostabilen Stoffes aus Hefe und Leber wieder heilbar war (15). Sie nannte diesen Stoff daher Schutzfaktor X. Er konnte später mit dem Biotin identifiziert werden. Zahlreiche spätere Tierversuche, in denen man Biotin-freie Kost gab oder

eine Diät, die als einzige Aminosäure-Quelle rohes Hühnereiweiss enthielt, zeigten gleichartige Erscheinungen, die nach Biotin-Gabe ebenfalls zurückgingen.

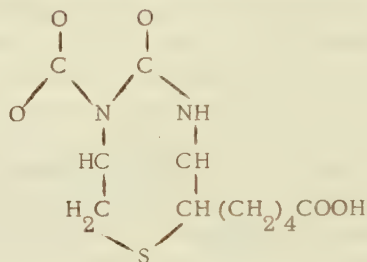
Durch Ernährungsversuche an Freiwilligen konnte die Bedeutung des Biotins auch für den Menschen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen machte Seydenstricker 1941 als erster. Der Schweizer Dermatologe Gautier (22) beschreibt nach seiner langjährigen klinischen Erfahrung folgende Symptome, die nach 3-4 wöchigem Biotin-Mangel bei seinen Patienten entstanden waren: eine nicht juckende Dermatis, Zungenpapillenatrophie, Hautabschilferungen an den Extremitäten, dann auch neurovegetative Symptome wie Depressionen, Anorexie, Nausea. Alles verschwand nach fünftägiger Biotin-Injektion von 200-300 μ g/Tag. Auch Freudenberg konnte statistisch nachweisen, dass während des Krieges eine Dermatitis Seborrhoides bei Brust-ernährten Kindern in der Schweiz viel seltener war als in Deutschland; er machte die unzureichende Ernährung während dieser Zeit dafür verantwortlich. Ein erhöhter und nicht gedeckter Biotin-Bedarf während der Schwangerschaft und der Laktationszeit macht sich bei den Säuglingen in den ersten Lebensmonaten, die für die Entwicklung sehr entscheidend sind, natürlich besonders bemerkbar.

Biotin beeinflusst also in Verbindung mit anderen B-Vitaminen das Hautorgan. Teilweise ist dies mit einer Störung des Fettsäurestoffwechsels der Haut in Beziehung zu bringen.

Seine Hauptaufgabe aber hat das Biotin noch auf anderem Gebiet zu erfüllen. Wie schon einleitend erwähnt, ist es als wasserlösliches Vitamin auch in der Lage, sich am Aufbau von Fermentwirkungsgruppen zu beteiligen und nimmt damit eine zentrale Stellung im Stoffwechsel ein.

Biotin-abhängige Reaktionen sind schon lange bekannt. Zu den ältesten Beispielen gehört die Bildung der Asparaginsäure aus Pyruvat (23); dann die Carboxylierung der Propionsäure zu Bernsteinsäure (24), der Aufbau der Oxalessigsäure aus Brenztraubensäure und CO_2 (25) und seine Dekarboxylierung (26). Die Aufmerksamkeit konzentrierte sich daher mehr und mehr auf Carboxylierungs- und Dekarboxylierungsreaktionen; auch die von Lardy und Mitarbeitern beschriebenen Enzymschäden bei Biotinmangel (24) stärkten diese Annahmen. Lebern Biotin-frei ernährter Ratten waren kaum noch befähigt, CO_2 in Purine einzubauen (27, 28), aus Ornithin und NH_3 das für die Harnstoffsynthese benötigte Citrullin zu bilden (24) oder CO_2 in die Acetessigsäure zu inkorporieren, die beim Leucinabbau erfolgt (24). Eine Katalyse der CO_2 -Fixation und der Dekarboxylierung durch Biotin war das Naheliegendste. Doch gehörte es lange zu den wenigen Vitaminen, deren biochemische Funktion noch ungeklärt blieb. Während Lardy annahm, Biotin könne durch alternative Öffnung und Schliessung des Ureidoringes das CO_2 inkorporieren (24), konnte Lynen dann

1959 den genauen Wirkungsmechanismus des Biotins am Beispiel der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aufzeigen (8). Dieses Enzym enthält als Wirkungsgruppe das Biotin. Bei der Carboxylierung des β -Methylcrotonyl-CoA zum β -Methylglutaconyl-CoA entsteht bei Anwesenheit von ATP und Mg^{++} intermediär ein sogenanntes "aktives CO_2 " in Form einer CO_2 -Biotinenzymbindung. Das CO_2 wird dabei (bei der Carboxylierung von freiem Biotin) mit einem der beiden N-Atome des Biotins in einer allophansäureartigen Struktur verbunden und danach erst aufs Acceptormolekül gebracht. (Die angenommene Allophan-



1'-N-Carboxybiotin

säurestruktur auch im Biotin-Enzym konnte in den darauffolgenden Jahren bewiesen werden (20, 29, 30)). Diese Bildung des "aktiven CO_2 " ist eine hochspezifische Reaktion. Sie verläuft nur mit Biotin bzw. Biotin-Enzymen (19), wobei Enzymgebundenes Biotin bei 20^0 in 1 Minute 760 Mol "aktives CO_2 " auf das β -Methylcrotonyl-CoA überträgt.

- 1) $ATP + HCO_3^- + \text{Biotin-Enzym} \xrightleftharpoons{Mg^{++}} CO_2\text{-Biotin-Enzym} + ATP + Po$
- 2) $CO_2\text{-Biotin-Enzym} + \beta\text{-Methylcrotonyl-CoA} \rightleftharpoons \text{Biotin-Enzym} + \beta\text{-Methylglutaconyl-CoA}$

Dieser Zweistufenprozess ist reversibel.

Die ATP- und Mg^{++} -Unabhängigkeit der zweiten Stufe wurde hinterher durch die Versuche von Ochoa und Leone in Frage gestellt (31). Diese unterschiedlichen Ergebnisse beruhen aber auf den verschiedenen Carboxylierungsmechanismen tierischer und der aus Bakterien isolierten Enzyme (32). Denn Enzyme bakteriellen Ursprungs, wie auch die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, brauchen im Gegensatz zu den tierischen Enzymen (z.B. die von Ochoa und Leone verwandte Propionyl-CoA-Carboxylase) kein ATP und kein Mg^{++} . Mn^{++} können Mg^{++} vertreten; für den vitalen Vorgang ist dies aber bedeutungslos, denn in den lebenden Zellen befinden sich im allgemeinen viel mehr Mg^{++} als Mn^{++} (33).

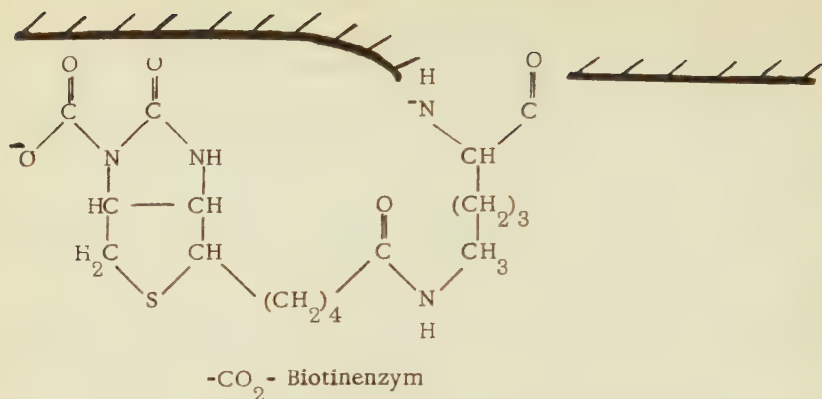
Diese Aufklärung des Biotin-Wirkungsmechanismus ist deshalb so bedeutend, weil bald für eine ganze Reihe von wichtigen Carboxylierungen und Dekarboxylierungen die allgemeine Gültigkeit dieses Reaktionsverlaufes erwiesen wurde. Genauso verläuft die Carboxylierung des Propionyl-CoA zum Methylmalonyl-CoA (34, 35) und des Pyruvats zum Oxalacetat (36). Und wie Lynen schon 1959 vermutete, wird auch das zur Fettsäuresynthese so benötigte Malonyl-CoA auf diese Art gebildet.

Alle bisher bekannten Enzymreaktionen, in denen das Biotin das Coferment darstellt, sind Kohlensäureübertragende Prozesse. Wahrscheinlich ist die reversible Aufnahme und Abgabe von CO_2 die einzige Funktion des Biotins im Stoffwechsel. Es sind zwar bei Biotin-Mangel auch andere Enzymaktivitäten herabgesetzt (24, 37, 38, 39). Wahrscheinlich enthalten diese Enzyme aber kein Biotin, sondern werden nur durch den Biotin-Mangel indirekt beeinflusst; diese Wirkungen dürften also nur sekundärer Natur sein.

Auch nach der Aufklärung seiner biochemischen Funktion im Jahre 1959 wurden die Untersuchungen über das Biotin fortgesetzt. In den letzten vier Jahren hat man z.B. weiteres über seine Synthese und seine Bindungsart ans Apoferment aufzeigen können, und da doch diese neuesten Entdeckungen über Biotin von akutem Interesse sind, möchte ich sie in dieser Arbeit mit erwähnen.

Der grösste Teil des Biotins liegt nicht in freier Form vor. Es ist fast ausschliesslich in sehr stabiler, hochmolekularer Form an Eiweiss gebunden (14). Dabei trifft ein Mol Biotin auf 344 000 g Eiweiss (19). Eine Verankerung zwischen der Carboxylgruppe des Biotins und der Aminogruppe einer im Eiweiss enthaltenen Aminosäure ist das Wahrscheinlichste gewesen (19), und mit Hilfe der von Thoma und Peterson (40) entdeckten Biotinidase hat diese Amidbindung auch aufgezeigt werden können. Biotin ist demnach eine Verbindung zwischen der Biotin-Carboxylgruppe und der ϵ -Aminogruppe eines im Eiweiss-Verband vorliegenden Lysinrestes (20, 29, 30). Diese Bindungsart ist im sogenannten Biocytin, dem ϵ -N-Biotinyl-L-Lysin vorgebildet, und schon Wright, der das Biotin 1952 aus Hefe isolieren konnte (41), vermutete in ihm ein Zwischenprodukt im Biotin-Enzymabbau.

Es ist noch fraglich, ob nicht das Biotin vielleicht ausser über die Carboxylgruppe auch noch an anderen Stellen mit dem Protein verbunden ist (35). Es gibt nämlich viele Beispiele für eine doppelte Verankerung von Enzymwirkungsgruppen mit dem zugehörigen Apoferment.



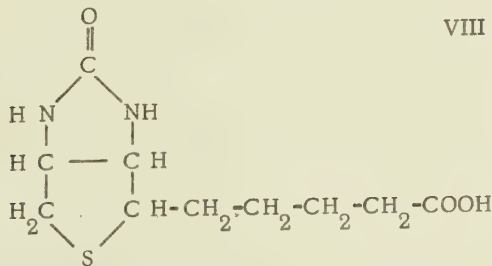
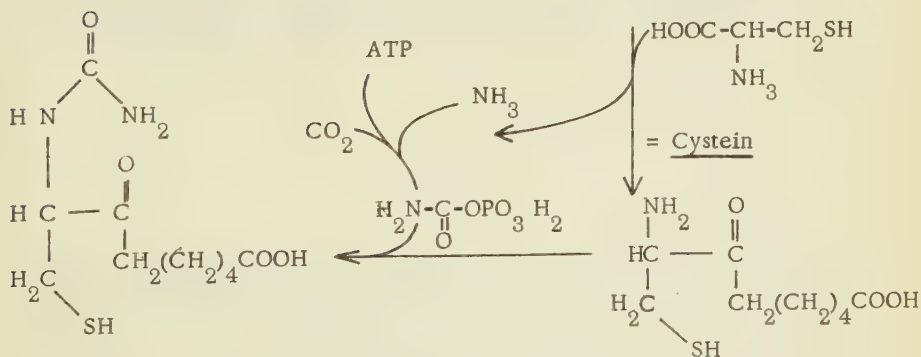
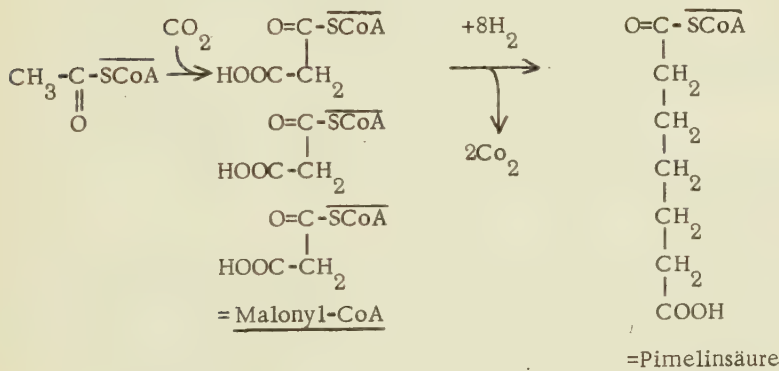
An dieser Stelle sei das Ferment Biotinidase besonders hervorgehoben, denn mit seiner Hilfe war es nicht nur möglich gewesen, die eben erwähnte peptidartige Bindung des Biotins an die ϵ -Aminogruppe des Lysins aufzuklären, sondern vor allem die Allophansäurestruktur auch des CO₂-Biotin-Enzyms. Die hohe Säureempfindlichkeit des fixierten CO₂ (19, 20) erlaubt keine Hydrolyse mit einer Säure oder mit Alkali, und auch die enzymatische Hydrolyse durch die gewöhnlichen Peptidasen und Proteinasen erfolgte immer nur bis zum Carboxybiocytin (40, 42). Nur die Biotinidase, die spezifisch auf den Biotinrest eingestellt ist, kann auch den letzten Schritt, nämlich die Spaltung des Carboxy-Biotin-Enzyms vom Enzymprotein bewerkstelligen. Damit ist auch ihre Bedeutung ausserdem für die Biotin-Speicherung und seine Wiederfreisetzung in aktiver Form erklärt. Denn wie vielleicht noch zu erwähnen sei, können die Biotinenzyme nur aus dem freien Biotin wieder aufgebaut werden (43).

Noch nicht gelungen ist, das ganze Apoferment eines Biotin-Enzyms darzustellen (29, 44). Denn die Bindungsstelle an das Vitamin kann bis jetzt erst nach Denaturierung oder nach teilweisem Abbau des Enzymproteins angegriffen werden (29).

Von der Biotinsynthese wusste man bis vor kurzem nur, dass bestimmte Mikroorganismen imstande waren, Biotin aus Pimelinsäure zu synthetisieren (45, 46). Pimelinsäure in markierter Form verabreicht, wird im Kohlenstoffgerüst des Biotins wiedergefunden. Lynens Hypothese, dass Cystein zur Synthese Schwefel und Kohlenstoffatome, Carbamylphosphat die Harnstoffgruppe beisteuert, stimmte mit seinen darauffolgenden Versuchen überein, und er konnte die einzelnen Stufen des Biotin-Aufbaues formulieren. Pimelinsäure, die aus drei Molekülen Malonyl-CoA gebildet wird, kondensiert sich mit Cystein. Durch Dekarboxylierung entsteht 9-Mercapto-8-amino-7-oxopellargonsäure (VIII).

Durch Umsetzung der Aminogruppe dieser Säure mit Carbamylphosphat entsteht ein Harnstoffderivat (IX), das unter Abspaltung von H_2O unmittelbar den doppelten Ringschluss zum Biotin eingehen kann (I) (47).

Biotin-Synthese



I = Biotin

Dieses Schema würde auch eine Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten von Desthiobiotin sein, welches Tatum (46) als Vorstufe der Biotin-Synthese annimmt und auch nachweisen konnte.

Wegen der Unentbehrlichkeit des Biotins ist es für uns wichtig zu wissen, wie hoch der tägliche Bedarf ist. Die Biotin-Zufuhr mit der Nahrung tritt an Bedeutung zurück, da die Gesamtmenge des vom menschlichen Organismus benötigten Biotins von den Darmbakterien synthetisiert wird. Der Mensch ist also normalerweise von der exogenen Zufuhr unabhängig. Anders verhält es sich bei Patienten, die unter der Einwirkung grosser Dosen von Sulfonamiden oder Antibiotica stehen, Stoffe, welche die Darmflora weitgehend ausschalten können. Die sich entwickelnden Biotin-Mangelerkrankungen können dann mit 2-3 g/kg Körpergewicht oder 150-200 µg/Tag behoben werden; dies entspricht dem "wahren" täglichen Bedarf (21).

Die Möglichkeit der klinischen Anwendung von Biotin wäre für uns Mediziner besonders interessant und könnte bei Störungen des Fettsäurestoffwechsels zu suchen sein, dann auch auf dem Gebiet der Hautkrankheiten im allgemeinen oder bei neurologischen Erkrankungen. Man weiss, dass Biotin ein vollkommen ungiftiger Stoff ist, dessen orale oder intravenöse Verabreichung selbst in grossen Dosen keine toxischen Erscheinungen hervorruft. Doch eine Biotintherapie, abgesehen bei den experimentell erzeugten Mangelerkrankungen, ist bis jetzt noch sehr umstritten und bedarf weiterer Bearbeitung.

AVIDIN

Das Avidin ist ein kristallisierendes, basisches Protein mit einem Molekulargewicht von 43 500. Als Eiweis ist es H₂O-unlöslich, aber löslich in verdünnten Salzlösungen. Es befindet sich besonders im Eiklar vor allem von Vogeleiern, in geringen Mengen auch in der Gallerthülle der Eier von Amphibien (21, 48). Über seine physiologische Bedeutung ist bisher noch nichts bekannt.

Avidin verbindet sich in stöchiometrischen Mengen mit dem Vitamin Biotin im Verhältnis 7 : 1 zu einem sehr stabilen, biologisch unwirksamen Komplex. Die Fixierung erfolgt dabei an der Harnstoffgruppierung des hydrierten Imidazolringes und wahrscheinlich an der Carboxylgruppe des Avidins (21). Diese Bindung kann weder durch proteolytische Fermente des Verdauungstraktes noch durch solche der Leber oder Niere aufgespalten werden. Lediglich beim Erhitzen wird das Avidin denaturiert, wobei das hitzebeständige Biotin aus dem Komplex freigesetzt werden kann. Diese unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Stoffe zeigte sich in der Biotin-Forschung von grossem Nutzen, da es

die einzige Möglichkeit ist, Biotin von dieser festen Verbindung wieder zu befreien. Es sei hier besonders darauf hingewiesen, dass ohne das von Werkman und Wessman (49) eingeführte Verfahren, nämlich der Nachweis der aktiven Beteiligung von Biotin bei Enzymreaktionen oder von bestimmten Biotin-Eigenschaften durch diese Komplexbildung mit Avidin, die Biotin-Forschung niemals den heutigen Stand erreicht hätte.

Die von Miss Boas zuerst erkannte Biotin-Avitaminose, die schon erwähnte sogenannte "egg-white-injury" (15), kommt dadurch zustande, dass grössere Mengen von zugeführtem rohen Eiweis das enteral gebildete Biotin abfangen und zu dem unlöslichen, inaktiven Komplex binden, so dass dieses nicht mehr seine vielfältigen Aufgaben im Stoffwechsel erfüllen kann.

Als Medizinerin möchte ich ein allerdings noch sehr in der Entwicklung begriffenes Gebiet kurz erwähnen. Die auch beim Säuger nachweisbare Wuchswirkung des Biotins liess die Frage aufkommen, ob dieses in der Krebsentwicklung eine Rolle spielen könnte, da Tumoren einen erhöhten Biotinbedarf haben. Eiklarfütterung hat das Wachstum dieser malignen Tumoren bei Ratten hemmen können; doch die auf Grund dieser Rattenversuche berechtigte Hoffnung, auch beim Menschen durch Avidin oder durch andere Biotin-antagonistisch wirkende Mittel Einfluss auf die Tumorentwicklung zu haben, konnte bisher nicht erfüllt werden (21).

II. PROBLEMSTELLUNG

Schon seit mehreren Jahren ist die enge Beziehung des Biotins zur Fettsäuresynthese bekannt. Wie von Brand und Seitz (50) 1958 bei der Darstellung einer Leberfermentpräparation gut ernährter Tauben auf einen stark die Fettsäuresynthese aktivierenden Faktor stiessen, dessen Absorptionskurve für die Anwesenheit von Purin- und Pyrimidinbasen (Purin = Pyrimidin + Imidazol) sprach, hat auch Wakil beweisen können (11), dass bei der biologischen Fettsäuresynthese ein Biotinprotein mitwirkte. Seit der Aufklärung der biochemischen Funktion des Biotins weiss man, dass es als Apoferment der Acetyl-CoA-Carboxylase eine zentrale Stellung im Fettsäurestoffwechsel einnimmt. Eine Hemmung durch Avidin muss sich daher auf den Intermediärstoffwechsel stark auswirken.

In Fortführung der in vitro-Versuche, die die Hemmung durch Avidin, das einer Fermentpräparation aus Taubenlebern zugesetzt wurde, aufzeigte, wollten wir in dieser Arbeit sehen, ob auch bei lebenden Tieren zusätzlich zu Avidin oder zu Hühnereiweiss, das dieses Protein in reichlichen Mengen enthält, gegebenes Biotin eine Hemmung der Fettsäuresynthese wieder aufheben kann.

Ebenfalls in Fortführung der in vitro-Versuche beschäftigten wir uns mit der Frage, ob andere Proteine auch in vivo die Fettsäuresynthese herabsetzen können. Dazu spritzten wir den Tieren die Proteine Albumin human, Albumin bovin und α -Globuline.

Die jeweiligen Testsubstanzen wurden den Tieren zu ganz bestimmten Zeiten gegeben. Dadurch erhielten wir einen Einblick, wie schnell diese i. m. gespritzten Hemmstoffe zur Wirkung gelangen, und wie lange diese Wirkung anhält.

Die Höhe der Fettsäuresynthese haben wir durch Aufarbeitung der Leber bestimmt; denn die Leber ist der wichtigste Bildungsort der Fettsäuren im Körper, nicht nur der Fettsäuresynthese aus den 2-Kohlenstoffresten des Zuckerabbaues, sondern auch derjenigen Fettsäuren, die bei der dauernden Erneuerung des Depotfetts gebildet werden müssen.

Die Fettsäuren werden wahrscheinlich in Form von Phosphatiden ans Blut abgegeben und an die peripheren Gewebe verteilt. So interessierte uns nicht nur die Höhe der Fettsäuresynthese allgemein der Lipide, sondern wir unterteilten diese weiter in eine acetonlösliche und eine acetonunlösliche Fraktion. Da die

acetonunlösliche Fraktion fast ausschliesslich aus Phosphatiden (Phosphorlipoiden) besteht, die acetonlösliche aus den eigentlichen Fetten (Neutralfetten), konnten wir aus dem Verhältnis N/P wichtige Schlüsse aus dem Energiebedarf des Körpers bei den Versuchen mit den einzelnen Testsubstanzen schliessen.

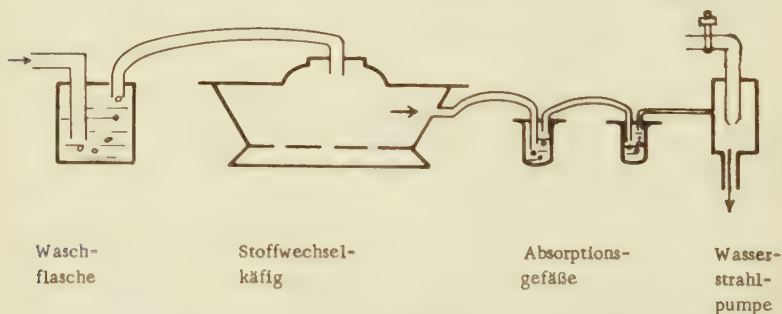
Zur radioaktiven Markierung der gebildeten Fettsäuren und des ausgeatmeten CO_2 nahmen wir das C^{14} , welches wir den Tieren in Form von $1\text{-C}^{14}\text{-Na-Acet}$ at als Ausgangsmaterial zur Synthese der Fettsäuren gaben.

Interessant war weiterhin aufzuklären, ob bei einem durch Avidin oder durch andere Biotin-Antagonisten ausgelösten Mangelzustand das Tier auch generell in einem dem Hungertier gleichen Zustand lebt. Um daher auch in die Verbrennungsvorgänge genaueren Einblick zu bekommen, bestimmten wir ebenfalls das von den Tieren ausgeatmete C^{14}O_2 quantitativ, getrennt in einzelnen Fraktionen in regelmässigen Zeitintervallen.

Für unsere Versuche nahmen wir 5-6 Monate alte Tauben; in diesem Alter ist die Fettsäuresynthese am grössten. Vorbedingung für eine normal hohe Fettsäuresynthese ist ausserdem eine reichliche Versorgung mit Wasser und kohlenhydratreichem Futter, denn wie vorausgegangene Versuche aus unserem Labor zeigten, ist die Fettsäuresynthese von der Menge und der Art der Nahrung sehr abhängig. Wir setzten daher die Tauben mindestens drei Tage vor dem Versuch in Einzelkäfige und hatten so von jeder einzelnen eine genaue Kontrolle über ihre Nahrungsaufnahme.

III. METHODIK

Die Taube bekommt $1 \text{ cm}^3 \text{ } ^{14}\text{C}$ -Na-Acetat (gemischt mit $1 \text{ cm}^3 \text{ Aqua dest}$) in den Kropf instilliert. Unmittelbar danach muss der Atmungsversuch beginnen. Die Taube wird in einem Stoffwechselkäfig (= Exsiccator von $\sim 3 \text{ l}$ Inhalt) mit zwei Bohrungen gesetzt. Durch diese zwei Bohrungen ist er einerseits mit der Aussenluft, andererseits mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden, welche für einen kontinuierlichen Luftdurchfluss sorgt. Eine vor den Stoffwechselkäfig geschaltete Waschflasche mit 20%iger NaOH sorgt für die Befreiung von CO_2 aus der Einatmungsluft. Wichtig ist die absolut quantitative Absorption des ausgeatmeten C^{14}O_2 . In zwei hintereinandergeschaltete, mit 20%iger NaOH gefüllte Gefäße zwischen Wasserstrahlpumpe und Stoffwechselkäfig wird die abgesaugte Atemluft eingeführt und die CO_2 quantitativ von Absorptionsfritten festgehalten. Mit Hilfe eines Zwei-Wegehahnes ist es möglich, während des Versuches ohne Unterbrechung zu zwei anderen Absorptionsgefäßen umzuschalten. Die ausgeatmetete Kohlensäure wird nach 15, 30, 60, 90, 120, 150 Minuten von Beginn des Versuches an gerechnet, getrennt aufgefangen und mit 28%igem Bariumchlorid in Ammoniumchloridhaltiger Lösung quantitativ als $\text{Ba C}^{14}\text{O}_3$ gefällt. Nach Filtration (mit einem Filtertigel) wird das $\text{Ba C}^{14}\text{O}_3$ bei 105° bis zur Gewichtskonstanz erwärmt und hinterher gewogen.



Zur Bestimmung der Aktivität wird ein Teil des Bariumkarbonats pulverisiert, in Äthanol aufgeschlemmt, auf Aluminiumplättchen von bekanntem Gewicht pipettiert, getrocknet, gewogen und im Methandurchflusszähler gemessen. Man misst also das aktive Karbonat in einer kleinen Menge des Niederschlags, stellt diese durch Wiegen fest, und von dieser Menge kann man dann auf die schon gewogene Gesamtmenge des aktiven C^{14}O_2 umrechnen.

Zu berücksichtigen ist die Selbstabsorption. Um diese möglichst klein zu halten, darf das Gewicht des $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$ auf den Aluminiumplättchen den Wert von 5 mg/cm^2 nicht überschreiten. Die gemessenen Aktivitäten-Werte werden dann nach den Richtlinien, wie sie im "Isotopic Carbon". angegeben sind, umgerechnet.

Unmittelbar nach Beendigung des Atmungsversuches wird die Taube getötet. Zur Aufarbeitung der Leber wird diese von anhaftendem Bindegewebe und Gefäßen sauber freipräpariert, gewogen und mit äquivalenter Menge Aqua dest in einem hochtourigen Homogenisator 2 Minuten lang homogenisiert. In einem Rundkolben (1 l Fassungsvermögen) werden 10 g des Homogenates (= 5 g Leber) langsam, um ein Zusammenballen zu vermeiden, mit 500 ml Bloorscher Lösung (= 3 Teile Alk. abs. mit Benzin vergällt + 1 Teil Äther) übergossen und eine Stunde lang bei 70°C im Thermostaten am Rückflusskühler erhitzt. Dadurch werden die Fette aus den zelligen Bestandteilen herausgelöst. Der Überstand wird abfiltriert, der verbliebene Rückstand nochmals mit einem Gemisch von 200 ml Chloroform und 20 ml Methanol 30 Min. lang bei 70°C gekocht. Chloroform löst die Fette, Methanol dient der vollständigen Ausfällung der Eiweisse. Um wirklich die Fette quantitativ zu erfassen, wird das gesamte Gemisch durch das schon benutzte Filter dazufiltriert, auch der mit Chloroform mehrmals nachgespülte Rückstand. Der abfiltrierte Überstand wird bei 50° im Vakuum bis zur Trockene eingedampft, danach nochmals mit 10-20 ml Alk. abs. (mit Benzin vergällt) versetzt und zur Trockene gebracht, um letzte Wasserreste zu entfernen. Auf diese Weise hat man die Gesamtfette erhalten. Der Rückstand wird in Petroläther gelöst und durch ein kleines Filter in einem 25 ml Messkolben filtriert und aufgefüllt. Davon giesst man 1 ml auf ein Aluminiumplättchen, das mit einem Stückchen Lenspapier belegt ist, und nach Abdampfen des Petroläthers wird die Aktivität im Methandurchflusszähler gemessen. Zur weiteren Auftrennung in die Neutralfette (N) und Phosphorlipide (P) haben wir weitere 12 ml in einem Zentrifugenglas bis zur Trockene eindampfen lassen und auf 0°C abgekühlt. Hinzugegebenes eiskaltes Aceton bringt die P in diesem Gemisch zur Fällung. Zur vollständigen Trennung der N und P wird das Ganze 24 Stunden lang bei 0°C stehengelassen, anschliessend der Überstand abfiltriert, zum Rückstand nochmals eiskaltes Aceton dazugegeben und nach längerer Zeit wieder das Überstehende durch das schon benutzte Filter dazufiltriert. Nachdem beide Fraktionen im Wasserbad eingedampft worden sind, löst man sie in Petroläther und füllt sie in einem Messkölbchen auf 10 ml auf. Zur Bestimmung der Aktivität wird von jeder Lösung 1 ml auf ein mit Lenspapier bedecktes Aluminiumplättchen pipettiert und im Methandurchflusszähler gemessen. Der Anteil der N und P kann dann nach der Formel $\frac{\text{Imp.} \cdot 10^4 \cdot 25}{12}$ auf das Gesamtvolumen von 25 ml angegeben werden. Meist ergeben sich kleine Differenzen zwischen den Gesamtfetten und der Summe von P und N, die auf Ver-

luste während der Aufarbeitung zurückzuführen sind.

Um die "relative spezifische Aktivität", also die Impulse pro mg Trockensubstanz zu bekommen, werden von allen drei Fraktionen je 5 ml in einem Wägeschälchen bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Danach kann wieder das Gewicht der N und P auf die Gesamtmenge von 25 ml umgerechnet werden nach der Formel: $\frac{g \cdot 10 \cdot 25}{12 \cdot 5}$

III. ERGEBNISSE

Bei der Auswertung der Versuche war deutlich zu sehen, dass Tauben, die kurz vor Versuchsbeginn noch reichlich Futter zu sich genommen hatten, weniger Aktivität in ihre Fettsäuren einbauten. Diese Absorption des radioaktiven C^{14} an die Weizenkörner kann man natürlich nicht vermeiden und lässt die Versuchsergebnisse etwas verwischen.

Ausserdem müssen auch jahreszeitlich bedingte Unterschiede in der Höhe der Fettsäuresynthese berücksichtigt werden, worauf von Brand und Seitz in ihren Arbeiten schon hingewiesen haben. Die Versuche brachten aber doch eindeutige Ergebnisse. (Alle Werte beziehen sich auf 5 g Leber).

Die Tabelle I zeigt die Radioaktivität der extrahierten Gesamtfette, Neutralfette und Phosphorlipide bei Normaltauben in Imp. $\cdot 10^4/\text{min}$. Der Quotient N/P gibt das Verhältnis der Aktivität zwischen Neutralfett und Phosphorlipiden an.

Tabelle I

Vers. Nr.	Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	N/P
19	4,53	1,05	1,17	1 : 1,104
21	7,56	1,38	2,93	1 : 2,123
22	2,87	1,72	0,99	1 : 0,559
32	4,31	2,54	1,77	1 : 0,697
70	4,21	2,67	1,32	1 : 0,494
Mittelwert	4,70	1,87	1,64	1 : 0,996

In der Tabelle II wird deutlich, dass Avidin (500 μ g Avidin 1 Std. vor Versuchsbeginn i. m. gegeben), die Fettsäuresynthese um 59 % unterbinden kann. Das Verhältnis N/P hat sich zugunsten der Phosphorlipide verschoben.

Tabelle II

	Vers. Nr.	Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	N/P
500 μ Avidin 1 Std. vor Versuchsbeginn	61	2,36	1,97	2,28	1 : 1,16
	62	0,85	0,83	0,85	1 : 1,02
	81	4,13	0,89	2,89	1 : 3,25
	82	0,42	0,19	0,15	1 : 0,79
	Mittelwert	1,94	0,97	1,54	1 : 1,56

Die Werte der folgenden Tabelle geben den fördernden Einfluss des Biotins auf die durch Hühnereiweiss bzw. durch reines Avidin ausgelöste Hemmung wieder.

In Versuch 83 wurde das Biotin 2 Stunden und das Avidin 1 Stunde vor Versuchsbeginn gespritzt, während in Versuch 69 und 85 das Biotin gleichzeitig mit dem Hühnereiweiss 1 Stunde vor Versuchsbeginn gegeben wurde.

Tabelle III

Substanz	Vers. Nr.	Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	Verh. N/P
500 γ Avidin 1 mg Biotin	83	2,76	1,31	1,69	1 : 1,29
0,5 mg Hüh- nereiweiss	69	3,03	1,22	1,26	1 : 1,03
1 mg Biotin	85	3,84	1,02	2,16	1 : 2,12
Mittelwert		3,21	1,18	1,70	1 : 1,48

Bei einem normal ernährten, nicht unter Biotinmangel gesetzten Tier, hat das Biotin keinerlei Einfluss auf die Höhe der Fettsäuresynthese, wie es die Tabelle IV angibt.

1 mg Biotin, in 0,5 ml Aqua dest gelöst, wurde 1 Std. vor Versuchsbeginn gespritzt.

Tabelle IV

Vers. Nr.	Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	N/P
67	3,49	0,71	2,83	1 : 3,99

Die Tabelle V zeigt die Senkung der Fettsäuresynthese auch durch andere Proteine an, die alle 1 Std. vor Versuchsbeginn gespritzt wurden. Dabei hemmen die Albumine nicht so stark (nur um 21 %) wie die α -Globuline. (Hemmung um 74 %).

Tabelle V

	Substanz	Vers. Nr.	Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	N/P
0,05 g	{ Alb. human	47	3,38	1,69	1,83	1 : 1,09
	{ Alb. bovin	48	3,99	1,72	3,26	1 : 1,89
	{ α -Glob.	59	1,21	0,99	1,21	1 : 1,22
	Mittelwert		2,86	1,47	2,10	1 : 1,40

In der Tabelle VI wird deutlich, dass nach den Injektionen von 0,5 ml Hühner-eiweiss 1 Std. bzw. 1+12+24 Std. vor Versuchsbeginn die Hemmung am grössten ist und zwar um 75 %, nach 4 Std. schon nachlässt (nur noch um 46 %) und nach 12 bzw. 12+24 Std. ganz abgeklungen ist.

Tabelle VI

Std. vor Ver-		Vers.Nr.	Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	N/P
suchsbeginn						
0,5 ml Hüh- ner- ei- weiss	1	43	0,93	0,28	0,56	1 : 2,00
		45	1,59	0,78	0,93	1 : 1,19
		51	1,52	0,61	0,97	1 : 1,59
	1+12+24	27	0,94	0,41	0,53	1 : 1,29
		29	1,24	0,54	0,62	1 : 1,15
		30	0,86	0,49	0,38	1 : 0,77
		37	1,20	0,45	0,72	1 : 1,60
	4	52	1,31	0,36	1,04	1 : 2,89
		56	3,71	1,06	2,30	1 : 2,17
		79	2,56	1,25	1,48	1 : 1,18
	12	44	4,54	1,99	2,22	1 : 1,12
		23	3,19	0,89	1,53	1 : 1,72
	12 + 24	25	4,14	1,46	1,80	1 : 1,23
		46	3,45	1,33	2,23	1 : 1,68

Die Tabelle VII zeigt eine ähnliche Stundenverteilung bei Avidin- bzw. α -Globulinzugabe.

Tabelle VII

Substanz	Std. vor		Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	N/P
	Vers.Beg.	Vers.Nr.				
500 Avidin	1+12	65	1,89	0,45	1,33	1 : 2,95
		87	4,25	1,36	2,04	1 : 1,50
	1+12 +24	63	1,94	1,54	2,44	1 : 1,65
		64	3,97	1,31	2,57	1 : 1,96
50 mg α -Globuline	1	59	1,21	0,99	1,21	1 : 1,22
	12+24	40	2,78	0,84	1,30	1 : 1,55
	1+12+24	41	1,62	0,64	0,95	1 : 1,49

Physiologische Kochsalzlösung oder Aqua dest (je 0,5 ml 1 Std. vor Versuchsbeginn gespritzt) zeigt keinerlei Einwirkung auf die Höhe der Fettsäuresynthese, wie die Werte in Tabelle VIII zeigen.

Tabelle VIII

Substanz	Vers. Nr.	Gesamtf.	Neutralf.	Phosphorl.	N/P
Aqua dest	49	3,08	1,03	1,86	1 : 1,81
	73	3,29	1,11	3,04	1 : 2,74
	75	4,65	1,37	2,67	1 : 1,96
Na Cl	50	5,09	1,64	3,60	1 : 2,19
	74	2,94	0,86	1,77	1 : 2,06
	76	6,65	1,99	4,01	1 : 2,02
Mittelwert		4,28	1,33	2,83	1 : 2,13

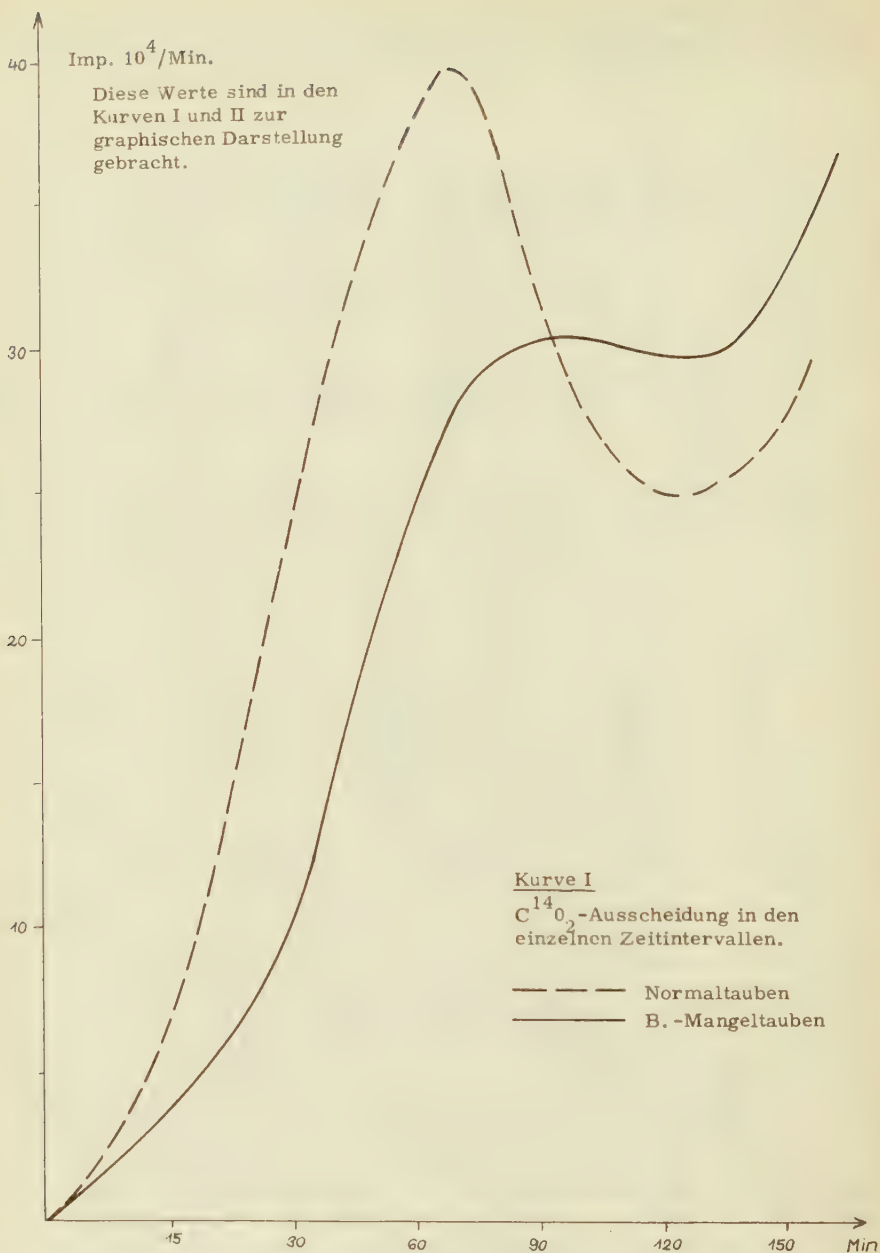
Die Tabelle IX gibt die spezifische Aktivität von Neutralfetten und Phosphorlipoiden bei Normal- und vorbehandelten Tauben wieder, angegeben in Imp/min je Trockensubstanz, sowie den Quotient aus diesen Werten.

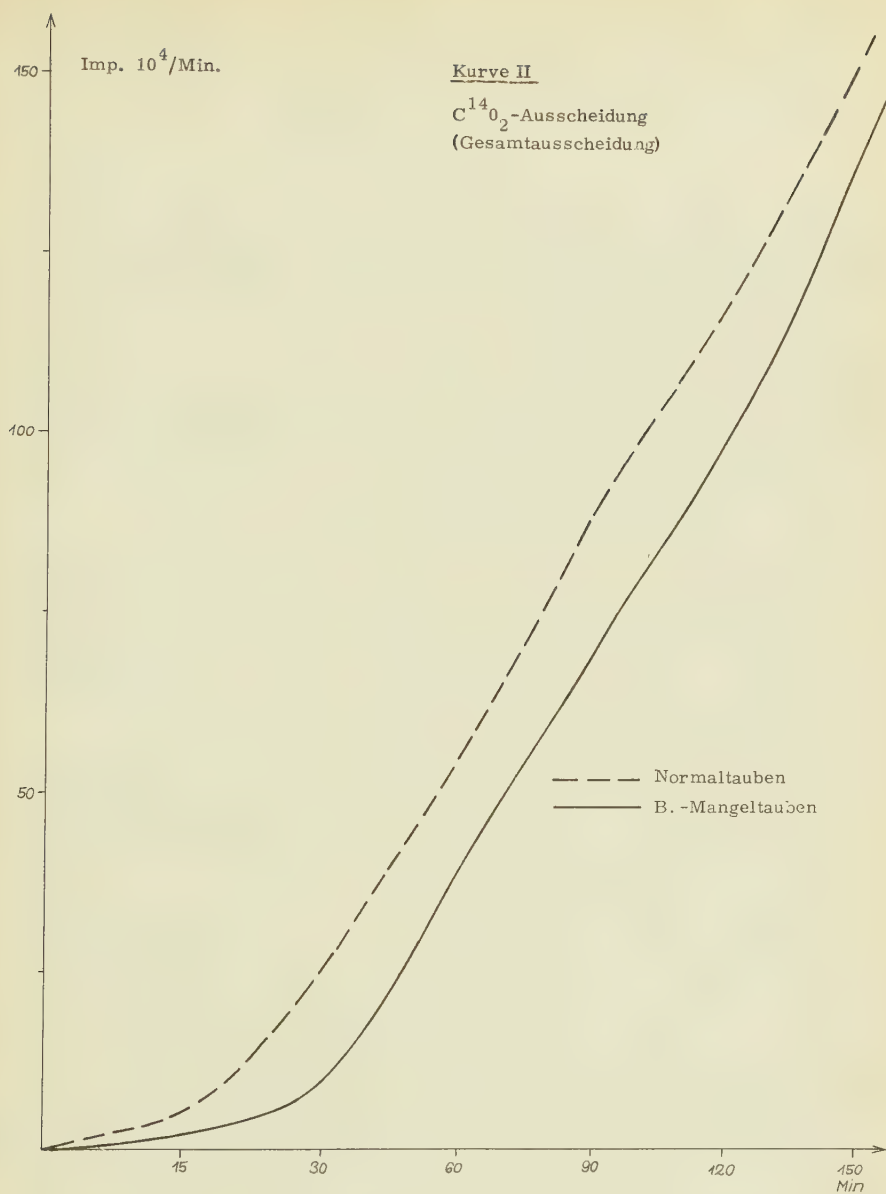
Tabelle IX

Vers. Nr.	relat. spez. Aktivität Neutralf.	Aktivität Phosphorl.	N/P (relat. spez. Aktiv.)
<u>Normaltauben</u>			
19	213	58	1 : 0,27
22	83	31	1 : 0,37
<u>0,5 ml Hühnereiweiss 1 Std. vor Versuchsbeginn</u>			
43	17	17	1 : 1,00
51	42	31	1 : 0,74
77	62	41	1 : 0,66
<u>0,5 ml Avidin 1 Std. vor Versuchsbeginn</u>			
61	169	153	1 : 0,91
62	92	52	1 : 0,57
81	274	193	1 : 0,71

Die Werte der Tabelle X zeigen die Höhe der $C^{14}O_2$ -Ausscheidungen in Imp. 10^4 /min von Normal- und unter Biotinmangel gehaltenen Tieren an.

Tabelle X												
Einzelwerte								Summenwerte				
Vers. Nr.	15'	30'	60'	90'	120'	150'	15'	30'	60'	90'	120'	150' Min.
Normaltauben												
15	5,16	32,2	20,8	33,7	35,5	19,6	5,6	37,8	58,7	98,4	134,0	153,6
16	5,3	20,5	39,8	27,1	20,4	17,9	5,3	25,8	65,7	92,8	113,3	131,2
27	8,4	25,7	54,4	29,6	21,2	28,6	8,4	34,1	88,5	118,1	139,3	167,9
70	2,9	12,9	24,6	32,6	19,4	47,8	2,9	15,8	40,4	73,1	92,6	140,4
Mittelwert	5,6	25,4	39,9	32,2	24,1	28,5	5,6	28,4	63,5	95,6	119,8	148,3
Biotinmangeltauben												
41	1,1	11,1	23,4	20,7	24,4	21,0	1,1	12,5	35,7	56,5	80,8	101,9
42	1,6	6,5	28,4	33,4	35,1	29,8	1,6	8,1	36,5	70,0	105,2	135,0
61	4,8	9,5	15,5	38,5	39,7	44,2	4,8	14,4	29,9	68,6	108,3	152,6
63	3,8	5,7	34,3	36,7	25,7	80,2	3,8	9,5	43,8	80,5	106,2	186,4
64	4,7	5,9	10,0	9,4	19,8	17,6	4,7	10,5	20,6	30,0	49,9	67,5
81	6,2	10,2	47,2	49,8	46,2	20,3	6,2	16,5	63,7	113,4	159,6	179,9
Mittelwert	3,3	8,2	26,5	32,1	31,8	35,5	3,3	11,9	38,3	69,8	101,6	137,1





V. DISKUSSION

dieser Werte

Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, ist das Biotin durch die bemerkenswerte Eigenschaft ausgezeichnet, dass es mit dem Avidin einen sehr stabilen Komplex bildet, der nicht durch die proteolytischen Fermente der Leber aufgespalten werden kann. Der Komplex ist biologisch unwirksam. Da dem Biotin die grosse Bedeutung im Verlauf der Fettsäure-Synthese über das Malonyl-CoA zukommt, der Komplex aber das Biotin in der Acetyl-CoA-Carboxylase blockiert, ist es ohne weiteres einzusehen, dass eine starke Hemmung der Fettsäuresynthese (um 59 %) durch Avidin erfolgen musste, wie es in der Tabelle II deutlich zum Ausdruck kommt.

Wakil (5, 11) schreibt in seinen Arbeiten ausführlich über seine in vitro-Versuche mit dem Hemmstoff Avidin. Durch Zusatz von Avidin konnte die Fettsäurebildung praktisch ganz unterbunden werden. Um noch genaueren Einblick in diese Avidin-Verbindung zu bekommen, erweiterte er seine Versuche durch zusätzliche Biotin-Gaben. Wurde das Avidin mit der gleichen Menge Biotin vorinkubiert, war keine Hemmung mehr wahrnehmbar. Avidin konnte durch das zugesetzte Biotin abgesättigt werden. Hatte aber die Blockierung der Acetyl-CoA-Carboxylase durch Avidin schon stattgefunden, war nachträglich gegebenes Biotin, auch im Überschuss, nicht mehr imstande, das gehemmte Ferment zu reaktivieren. Der Avidin-Biotin-Komplex ist sehr fest und dissoziiert gar nicht. Die gleichen Ergebnisse brachten die vorangegangenen, entsprechenden in vitro-Versuche aus unserem Labor.

Der fördernde Einfluss von Biotin auf die durch Avidin in ihrer Synthesefähigkeit herabgesetzte Fettsäurebildung wurde auch in unseren Versuchen ganz offensichtlich (Tab. III). Wie zu erwarten war, konnte also auch an lebenden Tieren das vor- oder gleichzeitig gespritzte Biotin die hemmende Wirkung von Avidin wieder aufheben. Dies kann man relativ leicht einsehen, wenn man sich die erniedrigte Fettsäuresynthese bei Avidingabe durch die verminderte Bereitstellung von Biotin für den Carboxylierungsvorgang erklärt. Das aus dem Muskel resorbierte Biotin wird jetzt das Avidin auffangen, bevor dieses mit dem Biotin in der Acetyl-CoA-Carboxylase einen Komplex bildet und es damit zum Ausfall dieses katalytisch wirkenden Fermentes kommen kann. Dazu genügen äquivalente Mengen von Biotin. Dieser Schluss wird durch die Tabelle III bestätigt, die deutlich die Förderung durch Biotin zeigt, sowohl bei den mit Avidin behandelten Tauben, als auch in den Versuchen, die mit rohem Hühnereiweiss, welches das Avidin in reichlichen Mengen enthält, durch-

geführt wurden. Diese antagonistisch wirkenden Testsubstanzen spritzten wir getrennt in den linken bzw. rechten m. pectoralis major und führten die Spritze jedesmal so ein, dass ihr Inhalt in entgegengesetzte Richtungen geleitet wurde. Eine eventuelle vorherige "Neutralisation" war so nicht mehr möglich.

Hier sei auch auf die Ratten-Experimente von Schreier (51) hingewiesen. I. m. gespritztes Biotin wurde am schnellsten und auch in den grössten Mengen von der Leber aufgenommen, dem Körperorgan, in welchem dieses Vitamin für die Zwecke des Intermediärstoffwechsels vorwiegend verbraucht wird. Das kam bei den Versuchen mit den Biotin-Mangeltieren noch deutlicher zum Ausdruck; diese retinierten noch mehr Biotin in ihrer Leber.

Dagegen liess sich eine Beeinflussung der Fettsäuresynthese durch Biotin allein nicht feststellen (Tab. IV). Wie es bei fast allen Säugetieren der Fall ist, so ist auch von der Taube anzunehmen, dass sie ihren Biotin-Eigenbedarf durch die enterale Synthese selbst deckt. Zusätzliches Biotin kann daher bei normal ernährten Tieren, die dieses Vitamin ausreichend besitzen, keine Synthesesteigerung mit sich bringen.

Als nächstes wurde die Wirkung von anderen Proteinen untersucht. Wie die Werte in der Tabelle V zeigen, fand auch hier in vivo eine reduzierte Fettsäuresynthese statt. Dabei zeigte sich aber, dass die Anzahl an markierten Fettsäuren bei den mit Albumin human und Albumin bovin behandelten Tauben grösser war als bei den α -Globulinversuchen. Der Grad der Hemmung lag beim α -Globulin etwa auf gleicher Höhe mit dem des Avidins. Dieser Befund steht auch mit den Ergebnissen unserer vorangegangenen in vitro-Versuche im Einklang. Aber wie lässt sich diese bevorzugte Hemmung durch die α -Globuline erklären? Darüber kann bis heute noch nichts Verbindliches ausgesagt werden, solange man sich über den genauen Wirkungsmechanismus des Hemmungsvorganges bei Proteinen noch nicht im klaren ist. Eine dem Avidin analoge Komplexbildung mit Biotin wäre das nächstliegende, aber Versuche mit dem α -Globulin allein genügen nicht, diese Vermutung zu bestätigen. Durch Biotin erweiterte Erklärungsversuche werden demnächst in unserem Labor vorgenommen. Man könnte sich auch die enorme Hemmungsfähigkeit des α -Globulins mit der Annahme erklären, dass es die Acetyl-CoA-Carboxylase oder ein bestimmtes anderes Enzym bzw. Enzyme der Fettsäuresynthese auf andere Weise inaktiviert. Oder es muss in irgend einer anderen Form seine hemmende Wirkung entfalten, so wie umgekehrt kürzlich von der Reinigung zweier Proteinfractionen die Rede war, die in förderndem Sinne in die Fettsäuresynthese eingriffen (9). Der genaue Angriffspunkt dieser beiden Proteine ist bis jetzt auch noch unbekannt. In unserem Labor laufen zur Zeit Elektrophoreseversuche mit Serumeiweiss; die α -Globulinfraktion kann die Fettsäurebildung am stärksten

hemmend beeinflussen, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmen würde. Ebenso wenig kann man bis jetzt Aussagen darüber machen, worin die Fähigkeit zur Hemmung bei den Albuminen liegt. Dieses Gebiet bedarf weiterer Bearbeitung.

Bei den ausgiebig durchgeführten Versuchen mit Hühnereiweiss, das wir jeweils zu bestimmten Zeiten vor Versuchsbeginn spritzten, zeigte sich deutlich die sofort einsetzende Wirkung des im Hühnereiweiss sich befindenden Avidins. Während die Hemmung bei den 4-Stunden vor Beginn des Versuches behandelten Tauben schon sichtbar nachliess und nur noch 46 % betrug, war bei den 12 bzw. 12 und 24-Stundenversuchen bereits wieder eine normal hohe Fettsäuresynthese festzustellen (Tab. VI). Es kann daraus geschlossen werden, dass das Avidin sofort seinen Komplex mit dem Biotin in der Acetyl-CoA-Carboxylase bildet, und es damit zur schlagartigen Senkung in der Fettsäurebildung kommt (um 75 %). Relativ schnell kann aber der normale Biotingehalt der Leber durch die enterale Resorption wiederhergestellt werden, so dass nach 12 Stunden keinerlei Hemmung mehr zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse lassen eine intensive Biotinsynthese im Bedarfsfall vermuten; neues Biotin wird nicht nur schnell wieder aus dem Darm nachgeliefert; auch sein Vorrat kann sogar durch mehrmaliges Spritzen mit den spezifischen Hemmstoffen nicht erschöpft werden.

Versuche mit reinem Avidin und mit α -Globulinen wurden in gleicher Weise fortgesetzt. Auch hier kristallisierte sich klar heraus, dass allein entscheidend die einstündige Wirkung ist.

Oder sollte die akut eintretende Hemmung etwa auf einen Schockzustand der Taube zurückzuführen sein, ausgelöst vielleicht reflektorisch durch Verletzung von Muskelgewebe oder durch Angst, und der dann nach gewisser Zeit abgeklungen wäre? Doch diesen sogenannten "Spritzeffekt" konnten wir eindeutig ausschliessen. Tauben, die wir 1 Stunde vor Ansetzen des Versuches mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. mit Aqua dest gespritzt hatten, zeigten eine normal hohe Fettsäurebildung (Tab. VIII).

Die durch Avidin oder die anderen Proteine gehemmten Versuche ergaben nicht nur eine geringere Ausbeute an Gesamtfetten. Auch bei der Auftrennung in die beiden Komponenten Neutralfette und Phosphorlipide waren Abweichungen gegenüber den normal angelegten Versuchen feststellbar. Während bei den Normaltauben die Radioaktivität der Neutralfette fast stets grösser war als die der Phosphorlipide (Tab. I; N/P = 1 : 0,996), hatte sich hier das Verhältnis N/P zugunsten der Phosphorlipide verschoben und betrug im Durchschnitt 1 : 1,48 (Tab. II, V). Noch deutlicher kommt dies bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität zum Ausdruck, d. h. der Impulse/Minute pro mg Trockensubstanz (Tab. IX). Daraus kann geschlossen werden, dass bei der experimentell ausgelösten Fettsäuresynthesehemmung die Phosphorlipid-Neusynthese

gegenüber der der Neutralfette weniger vermindert ist. Diese bevorzugte Bildung der Phosphorlipide deutet auf ihre Aufgaben im Stoffwechsel hin. Wie schon erwähnt, nimmt man an, dass die Triglyzeride der Leber, wenn sie vom Körper verwertet oder in die peripheren Fettgewebe transportiert werden, erst in Cholinphosphatide übergehen müssen. Ausserdem sind sie Strukturbestandteile von Zellen. Dies erklärt ihre im Verhältnis geringere Hemmung.

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der an Hungertauben durchgeführten Versuche überein (52). Nicht nur die Höhe an markiertem Gesamtfett war hier erniedrigt; auch die Auftrennung in die acetonlösliche und acetonunlösliche Fraktion ergab die gleiche im Verhältnis vermehrte Bildung von Phosphorlipiden gegenüber den Neutralfetten.

Ausserdem zeigte sich in diesen Versuchen, dass die neugebildeten markierten Fettsäuren vermehrt abgebaut wurden. Gleicht nun ein Biotin-Mangel tier auch in seinen Verbrennungsvorgängen einem Hungertier? Ein eventuell erhöhter Abbau der neugebildeten Fettsäuren war bei unseren Versuchen aber nicht anzunehmen, denn die isoliert verminderte Fettneubildung ruft noch keinen Hungerzustand im eigentlichen Sinn hervor. Das Depotfett, die Eiweisse und Kohlehydrate, die bei einem vorher gut ernährten Tier ausreichend vorhanden sind, müssten, wenigstens für einige Zeit, das fehlende Fett kalorisch voll vertreten können, während bei einem energiebedürftigen Hungertier das neugebildete Fett natürlich sofort an der Peripherie verbrannt werden muss. Die gehemmte Fettsynthese hätte in unseren Versuchen eher eine geringere $C^{14}O_2$ -Ausscheidung erwarten lassen. Eine wesentliche Änderung gegenüber den Normaltauben liess sich aber nicht feststellen, wie die Werte in der Tab. X und die graphische Darstellung dieser Werte in Kurve I und II zeigen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitend wurde auf die Bedeutung des Biotins im Stoffwechsel hingewiesen und die sich gegebenenfalls gefährlich auswirkende Komplexbildung mit dem Avidin erwähnt. Unsere Hauptaufgabe bestand darin, herauszufinden, ob auch bei lebenden Tieren diese durch Avidin ausgelöste Hemmung durch Biotin wieder aufhebbar ist. Es folgten Untersuchungen über den Einfluss von anderen Proteinen auf die Fettsäuresynthese in vitro, die Geschwindigkeit und Dauer ihrer Wirkung. Die prozentuale Verteilung der neugebildeten Neutralfette und Phosphorlipide brachten weitere Untersuchungen über den Einfluss dieser Hemmstoffe auf die im Körper ablaufenden Verbrennungsvorgänge mit sich.

Verwendet wurden normal ernährte Tauben und solche, die die jeweiligen Testsubstanzen zu bestimmten Zeiten einverleibt bekamen. Der Einbau des gefütterten $1\text{-C}^{14}\text{-Na-Acetats}$ in die neugebildeten Gesamtfette, Neutralfette und Phosphorlipide wurde verfolgt, und die Höhe des Abbaus der markierten Verbindungen durch Auffangen des ausgeatmeten C^{14}O_2 bestimmt.

- 1) Die mit Hühnereiweiss bzw. reinem Avidin behandelten Tauben zeigten eine deutlich verminderte Fettsäuresynthese gegenüber den Normaltauben um rund 65 %.
- 2) Auch in vivo können andere Proteine wie Albumin human, Albumin bovin und α -Globulin die Fettsäurebildung hemmend beeinflussen (Hemmung durch die Albumine um 21 %, durch die α -Globuline um 74 %). Der Angriffspunkt dieser Stoffe ist bis jetzt unbekannt, sodass auch die besonders starke Hemmung durch α -Globulin nicht erklärt werden kann.
- 3) Die sofortige Wirkung der Hemmstoffe nach der Resorption und die schnelle Biotin-Nachlieferung aus dem Darm zeigt sich durch die besonders starke Senkung der Fettsäurebildung bei den eine Stunde vor Versuchsbeginn behandelten Tieren. Ein eventuell ausgelöster Schockzustand durch den Spritzvorgang, der diese Stundenverteilung in der Höhe der Fettsäuresynthese erklären könnte, wurde eindeutig ausgeschlossen.
- 4) Auch bei lebenden Tieren kann vor- oder gleichzeitig gegebenes Biotin (in äquivalenten Mengen) eine Hemmung in der Bildung der Fettsäuren wieder aufheben. Dagegen hat es bei Normaltauben, die dieses Vitamin ausreichend besitzen, keinen Einfluss auf die Höhe der neugebildeten Fettsäuren.

- 5) Der Biotinmangel drückt sich vor allem in einer verminderten Neusynthese der Neutralfette aus, während die relativ vermehrt gebildeten Phosphorlipide zur Deckung des Energiebedarfs an der Peripherie ihre Transportfunktion weiterhin erfüllen.
- 6) Ein deutlicher Einfluss des Biotinmangels auf den Abbau der neugebildeten, markierten Fettsäuren war nicht festzustellen.

Zum Schluss sei nochmals erwähnt, dass das Gebiet über den fördernden bzw. hemmenden Einfluss von Proteinen auf die Fettsäuresynthese noch sehr in der Entwicklung begriffen ist. Die Untersuchungen darüber sollten deshalb fortgesetzt werden.

.VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Stansly, Beinert Biochim. biophys. Acta 11, 600 (1953)
- 2) Seubert, Greull, Lynen Angewandte Chemie 69, 359 (1957)
- 3) Roscoe, Brady Proc. Nat. Acad. of Sci. 44, 993 (1958)
- 4) Gibson, Titcherer, . Wakil
 J. Amer. Chem. Soc. 80, 2908 (1958)
- 5) Wakil Biochim. biophys. Acta 29, 225 (1958)
- 6) Porter, Wakil, Thietz, Jakob, Gibson
 Biochim. biophys. Acta 25, 35 (1957)
- 7) Klein J. Bact. 73, 530 (1957)
- 8) Lynen Angewandte Chemie 71, 481 (1959)
- 9) Lynen, Domagh, Goldmann, Kessel
 Biochem. Zeitschr. 335, 519 (1961/62)
- 10) Lynen, Eggerer Bioch. Zschr. 335, 540 (1961/62)
- 11) Wakil, Gibson Biochim. bioph. Acta 41, 122 (1960)
- 12) Stoffel Hoope-Seylers Zschr. für phys. Chemie 333
 (1963)
- 13) Oppenheimer Handbuch der Biochemie S. 825 und S. 894
 (1936)
- 14) György Zschr. ärztliche Fortbildung 28, S. 377 und
 S. 417 (1931)
- 15) Boas Biochim. J. 21, 712 (1927)
- 16) György, du Vigneaud Science, Washington 91, 243 (1940)
- 17) Kögl, du Vigneaud J. biol. Chem. 146, 487 (1942)
- 18) Folkers, Harris Science, Washington 97, 447 (1943)
- 19) Lynen Bioch. Zschr. 335, 123 (1961/62)
- 20) Knappe, Wenger, Wiegand
 Bioch. Zschr. 337, 232 (1963)

- 21) Stepp, Kühnau, Schröder
Die Vitamine und ihre klinische Anwendung
Stuttgart (1952)
- 22) Gautier, Thelin
Internationale Zschr. für Vitaminforschung
28, 61 (1957/58)
- 23) Winzler
Arch. Biochem. 5, 25 (1944)
- 24) Lardy
Phys. Rev. 33, 560 (1953)
- 25) Lardy
Phys. Rev. 169, 451 (1947)
- 26) Lichtenstein
J. biol. Chem. 170, 329 (1947)
- 27) Lardy
J. biol. Chem. 179, 733 (1949)
- 28) Lardy
J. biol. Chemie 223, 985 (1956)
- 29) Knappe, Biederlich, Brümmer
Angewandte Chemie 74, 432 (1962)
- 30) Lane, Lynen
Proc. Nat. Acad. of Sci. 49, 379 (1963)
- 31) Leone, Ochoa
Proc. Nat. Acad. of Sci. 46, 1319 (1960)
- 32) Seubert, Remberger
Biochem. Zschr. 334, 401 (1961)
- 33) Knappe, Ringelmann, Lynen
Bioch. Zschr. 335, 168 (1961/62)
- 34) Friedman
Biochim. Bioph. Res. Comm. 4, 266 (1961)
- 35) Lane
J. biol. Chem. 235, 3082 (1960)
- 36) Utter
J. biol. Chem. 234, 17 (1960)
- 37) Lardy
Biochim. Bioph. Acta 41, 166 (1960)
- 38) Battex
Helv. physiol. Acta 17, 175 (1959)
- 39) Ochoa
J. biol. Chem. 174, 979 (1948)
- 40) Thoma, Peterson
J. biol. Chem. 210, 569 (1954)
- 41) Wright
J. Amer. Chem. Sci. 74, 1996 (1952)
- 42) Wright, Cresson, Liebert, Sheggs
J. Amer. Chem. Sci. 74, 2004 (1952)
- 43) Kosow, Huang, Lane
J. biol. Chem. 237, 3633 (1962)

- 44) Knappe, Brümmer, Riederlich
Bioch. Zschr. 338, 599 (1963)
- 45) Du Vigneaud
Science 99, 186 (1942)
- 46) Tatum
J. biol. Chem. 160, 455 (1945)
- 47) Lynen, Knappe
Bioch. Zschr. 336, 510 (1962/63)
- 48) Fraenkel-Conrad, Snell
Arch. Biochim. 39, 97 (1952)
- 49) Wesmann, Werkman
Arch. Biochim. 26, 214 (1950)
- 50) v. Brand, Seitz
Klinische Wochenschrift
36. Jahrgang, 2. Heft, S. 87/88 (1958)
- 51) Schreier, Pfisterer
Internationale Zschr. für Vitaminforschung
29, 217 (1958/59)
- 52) v. Brand
Bioch. Zschr. 331, 162 (1959)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. W. SEITZ herzlichst für die freundliche Überlassung des Themas aus seinem Forschungsgebiet und den Arbeitsplatz im Isotopenlabor der Münchener Medizinischen Poliklinik danken.

Meiner Doktormutter, Dr. phil et Dr. med Vera NAGENGAST, schulde ich allen Dank für die Leitung in Theorie und Praxis. Sie führte mich in die theoretischen Grundlagen der speziellen biochemischen Fragen ein und betreute mich unermüdlich.

VIII. LEBENSLAUF

Am 17. 2. 1940 wurde ich als Tochter des Pastors Paul Lienau und seiner Ehefrau Ruth, geb. Cramer, in Burg auf Fehmarn geboren. Ostern 1946 wurde ich eingeschult und machte im Februar 1959 am Gymnasium am Falkenplatz in Lübeck die Reifeprüfung. Im Sommersemester 1959 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Hamburg, wo ich nach zwei Semestern das Vorphysikum ablegte. Vom Sommersemester 1960 an studierte ich in Erlangen und bestand dort im Oktober 1961 das Physikum. Nach sechs klinischen Semestern an den Universitäten Erlangen und München legte ich im Winter 1964/65 in München das Medizinische Staatsexamen ab.

